

SAS-MX Immunofix

Instructions For Use REF. I00300

SAS-MX Immunofix
Fiche technique

SAS-MX Immunofixation
Anleitung

SAS-MX Immunofissazione
Istruzioni per l'uso

Inmunofijación SAS-MX
Instrucciones de uso

Contents

English	1
Français	7
Deutsch	13
Italiano	19
Español	25



INTENDED PURPOSE

The SAS-MX IFE kit is intended for the separation and identification of monoclonal gammopathies by agarose gel electrophoresis with the Helena BioSciences SAS-MX electrophoresis chamber.

Immunofixation electrophoresis (IFE) is a two stage procedure using high resolution agarose electrophoresis in the first stage, and immunoprecipitation in the second phase.

The greatest demand for IFE is in the clinical laboratory, where it is used primarily for the detection of monoclonal gammopathies. A monoclonal gammopathy is a primary disease state in which a single clone of plasma cells produce elevated levels of an immunoglobulin of a single class and type. Such immunoglobulins are referred to as monoclonal proteins, M-proteins or paraproteins. Their presence may be of a benign nature or of uncertain significance. In some cases, they are indicative of a malignancy, such as multiple myeloma or Waldenström's macroglobulinaemia. Differentiation must be made between polyclonal and monoclonal gammopathies, as polyclonal gammopathies are a secondary disease state due to clinical disorders such as chronic liver disease, collagen disorders, rheumatoid arthritis and chronic infection.

Alfonso first described immunofixation in the literature in 1964¹. Alper and Johnson published a more practical procedure in 1969, and published a number of studies utilising this technique^{2,4}. Immunofixation has been used as a procedure for the investigation of immunoglobulins since 1976^{5,6}.

The SAS-MX IFE kit separates serum proteins according to charge in an agarose gel. The proteins are then incubated with monospecific antisera, washed and stained to allow visualization of the immunoprecipitate for qualitative interpretation.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

All reagents are for in-vitro diagnostic use only. Do not ingest or pipette by mouth any kit component. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheet for risk and safety phrases and disposal information.

COMPOSITION

1. SAS-MX IFE Gel

Contains agarose in a Tris / Barbitol / Aspartate buffer with sodium azide as preservative. The gel is ready for use as packaged.

2. Tris / Barbitol Buffer Concentrate

Contains concentrated Tris / Barbitol buffer with sodium azide as preservative. Dilute the contents of the bottle to 1 litre with purified water and mix well.

3. Acid Blue Stain Concentrate

Contains concentrated Acid Blue stain. Dilute the contents of the bottle to 700ml with purified water. Stir overnight and filter before use. Store in a tightly stoppered bottle.

4. SAS-MX IFE Antisera Kit

Contains SP protein fixative (containing acetic acid and sulphosalicylic acid), and monospecific antisera to human immunoglobulins - IgG, IgA, IgM, Kappa Light Chain (free & bound) and Lambda Light Chain (free & bound). All antisera contain sodium azide as a preservative. The antisera are ready for use as packaged.

5. Destain Solution Concentrate

Contains concentrated Destain Solution. Dilute the contents of the bottle in 2 litres of purified water. Store in a tightly stoppered bottle.

6. Other Kit Components

Each kit contains Instructions For Use and sufficient Sample Application Templates, Antisera Templates and Blotters A, B, C, D and X to complete 10 gels.

STORAGE AND SHELF-LIFE

1. SAS-MX IFE Gel

Gels should be stored at 15...30°C and are stable until the expiry date indicated on the package. DO NOT REFRIGERATE OR FREEZE. Deterioration of the gel may be indicated by 1) crystalline appearance indicating the gel has been frozen, 2) cracking and peeling indicating drying of the gel or 3) visible contamination of the agarose from bacterial or fungal sources.

2. Tris / Barbital Buffer

The buffer concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C. Cloudiness or poor performance of the diluted buffer may indicate deterioration.

3. Acid Blue Stain

The stain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted stain solution is stable for 6 months at 15...30°C. It is recommended to discard used stain immediately to prevent depletion of staining capability. Poor staining performance may indicate deterioration of the stain solution.

4. SAS-MX IFE Antisera Kit

The antisera kit should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Particulate contamination or cloudiness may indicate deterioration.

5. Destain Solution

The destain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted destain solution is stable for 6 months at 15...30°C. Cloudiness may indicate deterioration.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 4063 SAS-MX Chamber

Cat. No. 1525 EPS600 Power Supply

Cat. No. 9400 IFE Control Kit

Cat. No. 4062 Incubation Chamber

Cat. No. 9035 Immuno SuperPress / Cat. No. 5014 Development Weight

Drying oven with forced air capable of 60...70°C

Saline Solution (0.85% NaCl)

Purified water

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Freshly collected serum is the specimen of choice. Samples can be stored refrigerated at 2...6°C for up to 72 hours or 2 weeks at -20°C. Urine and CSF can also be used following a suitable concentration step:

Total Protein (mg/dL)	Conc. Factor
<50	100 x
50 - 100	50 x
100 - 300	25 x
300 - 600	10 x
600 - 1000	5 x

These concentrated CSF and urine samples should be used neat on the gel.

Serum samples should be diluted 1 + 1 in the SP Lane, and diluted 1 + 9 with saline solution for all 5 immunoglobulin lanes.

When typing minimono-clonal bands, the sample for the immunoglobulin lanes should be undiluted serum.

When typing high concentration monoclonal bands, the sample for the immunoglobulin lanes should be diluted more than 1 + 9 to prevent prozoning.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Remove the gel from the packaging and place on a paper towel. Remove the overlay and blot the gel surface with a blotter C, discard blotter.
2. Align the sample application template with the arrows at the edge of the gel. Place a blotter A on top of the template and rub a finger across the slits to ensure good contact. Remove the blotter and retain for use in Step 5.
3. Apply 3µl of sample to each slit and allow to absorb for 5 minutes.
4. Whilst the samples are absorbing, pour 40ml of buffer into each inner section of the SAS-MX Chamber.
5. Following sample absorption, blot the template with the blotter A retained from Step 2 and remove both blotter and template.
6. Position the gel in the chamber agarose side up, aligning the positive (+) and negative (-) sides with the corresponding positions on the chamber.
7. Electrophorese the gel: 120 volts, 25 minutes.
8. Following electrophoresis, place the gel into the incubation chamber containing a wet blotter and position the antiserum application template onto the gel surface. **NOTE:** Ensure good contact of template and gel.
9. Apply 1µl of the appropriate IFE Control to the wells in the gel. Close the incubation chamber and allow to absorb completely (approximately 3 minutes).
10. Apply 2 drops of Protein Fixative to the SP lane and 2 drops of the appropriate antiserum into the immunoglobulin lanes. Ensure even distribution of antiserum in the lane (including the control wells) by rocking the gel.
11. Incubate the gel at 15...30°C for 10 minutes.
12. Following incubation, remove the antiserum template by briefly washing the gel in saline solution with gentle agitation.
13. Place the gel on a blotter D agarose side up. Place a blotter B (wetted in saline) onto the surface of the gel followed by a blotter X. Press the gel in an IFE SuperPress for 5 minutes or use a

development weight for 10 minutes.

14. Remove the blotters and place the gel in saline solution for 4 minutes with gentle agitation.
15. Place the gel on a blotter D agarose side up. Place a blotter B (wetted in saline) onto the surface of the gel followed by a blotter D. Press the gel in an IFE Superpress for 1 minute or use a development weight for 3 minutes.
16. Remove the blotters and dry the gel at 60...70°C.
17. Immerse the dry gel in stain solution for 4 minutes.
18. Destain the gel in 2 x 2 minute washes of destain solution.
19. Wash the gel briefly in purified water and dry.

INTERPRETATION OF RESULTS

The majority of monoclonal proteins migrate in the cathodic, gamma region of the protein pattern, but due to their abnormal nature, they may migrate anywhere within the globulin region on protein electrophoresis. The monoclonal protein band on the immunofixation pattern will occupy the same position and shape as the abnormal band on the serum protein pattern. The abnormal protein is identified by the antiserum type it reacts with.

When low concentrations of abnormal protein are present, the abnormal band may appear as a band within the normal polyclonal immunoglobulin. A band can also be seen within a polyclonal background when there is a large polyclonal immunoglobulin presence also.

The publication 'Immunofixation for the Identification of Monoclonal Gammopathies' is available from Helena BioSciences on request.

LIMITATIONS

1. Antigen Excess

Antigen excess will occur if there is not a slight antibody excess or antigen / antibody equivalence at the site of precipitation. Antigen excess in IFE is usually due to an excess of the immunoglobulin in the patient sample. Antigen excess is characterised by prozoning (unstained areas in the centre of the immunofixed protein band, with staining around the edges). A higher dilution of the sample should be used in this event to optimise the immunoglobulin concentration.

2. Non-Specific Precipitation in All Immunoglobulin Lanes

Occasionally a completed IFE plate exhibits a precipitate band in the same position in every pattern across the plate. This may result from:

a) IgM monoclonal immunoglobulins.

IgM monoclonal proteins can adhere to the gel matrix. A band will appear in all 5 antiserum lanes of the gel. However, where the band reacts with a specific antiserum for the heavy chain and light chain, there will be an increase in size and staining intensity of the band, allowing the immunoglobulin type to be identified. Additional dilution of the sample will improve the discrimination between the IgM-antibody reaction and the non-specific staining of precipitated IgM protein in other lanes, simplifying the diagnosis.

b) High Titres of RF or Immune Complexes.

Samples with high titres of Rheumatoid Factor or other immune complexes may show a precipitate band at the sample application point. Reducing the sample with DTT or β -2-mercaptoethanol can eliminate this non-specific reaction (Mix 190 μ L of diluted serum to 10 μ L of 1% (w/v) DTT in 0.85% saline solution or mix 100 μ L of serum with 10 μ L of a 1:10 dilution of β -2-mercaptoethanol in water. Perform the IFE as usual. **NOTE:** Always work in a fume hood when using β -2-mercaptoethanol).

c) Fibrinogen.

Fibrinogen, if present in the sample, will show as a discrete band in all lanes of the immunofixation pattern. Fibrinogen is present in plasma, and sometimes in the serum of patients on anticoagulant therapy.

3. Reaction With Kappa or Lambda Light Chain Antisera but No Reaction with IgG, IgA or IgM Heavy Chain Antisera.

Samples showing this pattern may either have a free light chain monoclonal gammopathy or they may have an IgD or IgE monoclonal protein. In this situation, the IFE should be repeated, substituting IgD and IgE antisera for two of the other heavy chain antisera. Failure to obtain a reaction with IgD or IgE antisera would be indicative of free light chain disease.

4. Band In Gamma Region Showing No Reactivity With IFE Antisera.

C Reactive Protein (CRP) may be detected in patients with acute inflammatory response^{7,8}. CRP appears as a narrow band at the cathodic end of the serum protein pattern. Elevated Alpha-1-Antitrypsin and Haptoglobin are supportive evidence for CRP. Patients with a CRP band will probably have an elevated level when assayed for CRP. A narrow band on the point of sample application can sometimes be seen which can be caused by chylomicrons in the serum or precipitated protein in samples which have been stored frozen.

5. Non-Reactivity With Kappa and Lambda Antisera.

Occasionally a sample will have a reaction with a heavy chain antiserum but no light chain reaction is obvious. In this situation, the following need to be ruled out - a) Heavy chain disease, b) Very high concentrations of light chains, leading to antigen excess, c) Low concentrations of light chains, d) A typical light chain molecule that does not react with the antiserum, e) Light Chains with 'hidden' light chain determinants (as sometimes seen with IgA and IgD). To obtain definitive results, testing may include a) A higher or lower dilution of the sample to optimise the antibody / antigen equivalence, b) Antisera from more than one manufacturer to aid in the identification of atypical immunoglobulins, and c) Treat the sample with β -2-mercaptoethanol to 'reveal' the light chains.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A series of samples were tested and compared to another commercially available test kit - both kits showed equivalent results.

OPTIONAL EXTRA MATERIALS

Cat. No. 9249 Antiserum to Human IgD

Cat. No. 9250 Antiserum to Human IgE

Cat. No. 9412 Antiserum to Human Free Kappa Light Chain

Cat. No. 9413 Antiserum to Human Free Lambda Light Chain

BIBLIOGRAPHY

1. Afonso, E., 'Quantitation Immunoelectrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
2. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox Sang., 1969; 17 : 445-452.
3. Alper, C.A., 'Genetic Polymorphism of Complement Components as a Probe of Structure and Function', Progress in Immunology. First International Congress of Immunology. 1971 : 609-624, Academic Press, New York.

4. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of α -1-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of PiM.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
5. Cawley, L.P., Minard, B.J., Tourtellotte, W.W., Ma, B.I. and Chelle, C. 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976; 22 : 1262-1268.
6. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
7. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B., and Franzén, B. 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.
8. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K., and Tylia, M.M. 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

UTILISATION

Le kit SAS-MX IFE est utilisé pour la séparation et l'identification des gammopathies monoclonales par électrophorèse en gel d'agarose avec la chambre de migration Helena BioSciences SAS-MX.

L'immunofixation (IFE) est une procédure en deux étapes utilisant l'électrophorèse haute résolution en gel d'agarose dans un premier temps puis l'immunoprécipitation dans un deuxième temps.

C'est en biologie médicale que l'on utilise le plus fréquemment l'IFE pour la détection des gammopathies monoclonales. Une gammopathie monoclonale est un état primaire de maladie dans laquelle un seul clone de cellule plasmatique produit en quantité élevée une immunoglobuline d'une seule classe et d'un seul type. Ces immunoglobulines sont appelées protéines monoclonales, protéines-M ou paraprotéines. Leur présence peut être de nature bénigne ou de signification incertaine. Dans certains cas, elles révèlent une malignité comme les myélomes multiples ou Waldenström. Une différence doit être faite entre gammopathie polyclonale ou monoclonale, la gammopathie polyclonale étant le stade secondaire de maladie due à un désordre clinique comme l'affection chronique hépatique, les désordres du collagène, les rhumatismes articulaires et les infections chroniques.

Alfonso fut le premier à décrire l'immunofixation dans la littérature en 1964¹. Alper et Johnson publièrent ensuite une procédure plus simple en 1969, puis de nombreuses études utilisant cette technique^{2,4}. L'immunofixation est utilisée comme procédure d'investigation des immunoglobulines depuis 1976^{5,6}.

Le kit SAS-MX IFE sépare les protéines sériques selon leur charge en gel d'agarose. Les protéines sont ensuite mises en contact avec un antisérum monospécifique, lavées et colorées pour permettre la visualisation de l'immunoprécipité en vue d'une interprétation qualitative.

PRECAUTIONS

Tous les réactifs sont à usage diagnostic in-vitro uniquement. Ne pas ingérer ou pipeter à la bouche aucun composant. Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

COMPOSITION

1. Plaque SAS-MX IFE

Contient de l'agarose dans un tampon Tris / barbital / aspartate additionné d'azide de sodium comme conservateur. Le gel est prêt à l'emploi.

2. Tampon concentré SAS-MX Tris / Barbital

Contient de tampon Tris / Barbital concentré avec d'azide de sodium comme conservateur. Diluer la bouteille à 1 litre avec d'eau distillée et mélanger.

3. Colorant Acide Bleu concentré

Contient du colorant acide bleu concentré. Diluer le contenu du bouteille dans 700ml d'eau distillée, laisser sous agitation toute une nuit. Filtrer avant utilisation. Conserver en bouteille récipient fermée.

4. SAS-MX IFE Antiséra kit

Contient un bouteille de solution fixative SP contenant de l'acide acétique et de l'acide sulfosalicylique, et des antiséra monospécifiques dirigés contre les immunoglobulines humaines - IgG, IgA, IgM, Chaîne légère Kappa (Libre et liée), Chaîne légère Lambda (Libre et liée). Tous les antiséra contiennent d'azide de sodium comme conservateur. Les antiséra sont prêts à l'emploi.

5. Solution décolorante concentrée

Contient 40ml de solution décolorante concentrée. Diluer le contenu du bouteille dans 2 litres d'eau distillée. Conserver en bouteille récipient fermée.

6. Autres composants du kit

Chaque kit contient également 1 fiche technique, des buvards A, B, C, D et X, des masques applicateur (Template) et des masques applicateur antisérum pour 10 gels.

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Plaque SAS-MX IFE

Les gels doivent conservés entre 15...30°C, ils sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. **NE PAS REFRIGERER OU CONGELER.** Les conditions suivantes indiquent une détérioration du gel: 1) cristaux visibles indiquant que le gel a été congelé, 2) de craquelures témoins d'une déshydratation du gel, 3) une contamination visible bactérienne ou fongique.

2. Tampon Tris / Barbitol

Le tampon concentré doit être conservé entre 15...30°C, il est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette. Le tampon dilué est stable 2 mois entre 15...30°C. Un aspect floconneux ou une perte de performance indique une détérioration.

3. Colorant Acide Bleu concentré

Le colorant concentré doit être conservé entre 15...30°C, il est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette. Le colorant dilué est stable 6 mois entre 15...30°C. Il est recommandé de rejeter le colorant utilisé afin de prévenir une diminution de la capacité de coloration. Une performance de coloration diminué, indique une détérioration.

4. SAS-MX IFE ANTISERA kit

Les antiséra doivent être conservés entre 2...6°C et sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette. Une contamination ou un aspect floconneux indique une détérioration.

5. Solution décolorante concentrée

Le décolorant concentré doit être conservé entre 15...30°C, il est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette. Le décolorant dilué est stable 6 mois entre 15...30°C. Un aspect floconneux indique une détérioration.

MATERIELS NECESAIRES NON FOURNIS

Réf. 4063 Chambre de migration SAS-MX

Réf. 1525 Générateur EPS600

Réf. 9400 IFE contrôle Kit

Réf. 4062 Chambre d'Incubation

Réf. 9035 Immuno SuperPress ou Réf. 5014 Poids à développement

Etuve ventilée jusqu'à 70°C

Solution saline (0.85% NaCl)

Eau distillée

PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS

L'utilisation de sérums fraîchement prélevés est fortement recommandée. Les échantillons peuvent être conservés 72 heures entre 2...6°C ou 2 semaines à -20°C. Urine et LCR peuvent être utilisés après une concentration préalable:

Protéine totale (mg/dL)	Facteur de concentration
< 50	100 x
50 - 100	50 x
100 - 300	25 x
300 - 600	10 x
600 - 1000	5 x

Les concentrats d'urine ou de LCR doivent être utilisés purs sur la gel.

L'échantillon doit être dilué au 1 + 1 pour la case SP et dilué au 1 + 9 en solution saline pour les 5 autres cases.

Lors de typage de fine bande monoclonale, l'échantillon doit être déposé pur dans toutes les cases.

Lors de typage de très importante bande monoclonale, pour les cases des immunoglobulines, la dilution de l'échantillon doit être supérieure au 1/10 afin d'éviter le phénomène de zone.

METHODOLOGIE

- Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un papier absorbant. Retirer le protecteur et sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
- Disposer le masque applicateur échantillon en faisant correspondre les flèches avec les 2 fentes latérales. Placer un buvard A sur le masque et passer délicatement le doigt sur les fentes afin d'assurer un contact optimal. Retirer le buvard et le conserver pour l'étape 5.
- Déposer 3µL d'échantillon sur chaque fente et laisser absorber 5 minutes.
- Pendant ce temps, verser 40ml de tampon dans chaque compartiment intérieur de la chambre de migration SAS-MX.
- A l'aide du buvard A, retirer l'excès d'échantillon. Jeter le buvard et le masque applicateur.
- Déposer le gel, agarose vers le haut, dans la chambre de migration, en respectant les polarités.
- Faire migrer à: 120 Volts, 25 minutes.
- Après migration, déposer le gel sur un buvard humide dans la chambre d'incubation et positionner le masque applicateur antisérum sur le gel. **NOTE:** Assurer un contact optimal entre le masque et le gel.
- Déposer 1µL de contrôle IFE dans le puits approprié du gel. Fermer la chambre d'incubation et attendre l'absorption complète (environ 3 minutes).
- Déposer 2 gouttes de solution fixative dans la case SP et 2 gouttes de l'antisérum correspondant dans les cases respectives. Assurer la parfaite répartition de l'antisérum dans la case (même dans les puits de contrôle) en inclinant le gel.
- Laisser incuber le gel et les antiséras 10 minutes entre 15...30°C.
- Après l'incubation, retirer le masque applicateur par lavage rapide en solution saline sous agitation douce.
- Placer le gel, agarose vers le haut, sur un buvard D. Déposer un buvard B (imbibé de solution saline) sur le gel puis par dessus un buvard X. Presser à l'aide de L'IFE SuperPress pendant 5 minutes (10 minutes en cas d'utilisation des poids à développement).
- Retirer les buvards et placer le gel dans un bain de solution saline sous agitation douce pendant 4 minutes.

15. Sortir le gel de la solution saline et le placer sur un buvard D, agarose vers le haut. Déposer un buvard B (imbibé de solution saline) sur le gel puis par dessus un buvard D. Presser pendant 1 minutes dans l'IFE SuperPress (3 minutes avec les poids à développement).
16. Retirer les buvards et sécher le gel entre 50...60°C.
17. Plonger le gel dans le colorant pendant 4 minutes.
18. Décolorer le gel 2 x 2 minutes dans la solution décolorante.
19. Rincer brièvement le gel à l'eau distillée et sécher entre 50...60°C.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La majorité des protéines monoclonales migrent du côté cathodique, dans la région des gamma du protidogramme, mais du fait de leur nature anormale, elles peuvent migrer dans la zone des globulines. La protéine monoclonale doit occuper la même position et avoir la même forme que la bande anormale du protéinogramme. La protéine anormale est identifiée par les antiséras avec les quelles elle a réagi. De la cas de faible concentration d'une protéine anormale, celle-ci peut apparaître comme une bande dans un environnement d'immunoglobuline polyclonale normal. Une bande peut aussi être détectée dans un bruit de fond polyclonal lorsqu'il y a également augmentation polyclonale des immunoglobulines.

La publication "Immunofixation for the identification of Monoclonal Gammopathies" est disponible auprès d'Helena BioSciences sur demande.

LIMITES

1. Excès d'antigène.

L'excès d'antigène se produit lorsqu'il n'y a un manque d'excès d'anticorps ou une faible équivalence antigène / anticorps au niveau du site de précipitation. L'excès d'antigène en IFE est essentiellement dû à un excès d'immunoglobuline dans le sérum du patient. Cet excès se caractérise par un "effet de zone" (apparition d'une zone incolore cernée de colorant). Une dilution supérieure de l'échantillon est nécessaire pour optimiser la concentration d'immunoglobuline.

2. Précipitation non spécifique dans toutes les cases.

Occasionnellement, une IFE montre une bande précipitant au même niveau dans toutes les cases. Cela peut provenir de:

a) Immunoglobuline monoclonale de type IgM.

Les protéines monoclonales de type IgM ont tendance à adhérer sur la trame du gel. Une bande apparaît donc dans les 5 cases. Toutefois, la chaîne lourde et ses chaînes légères correspondantes apparaissent nettement plus colorées et mieux définies, ce qui permet l'identification de la protéine anormale. Une dilution plus importante de l'échantillon permet d'améliorer la différenciation entre la réaction avec l'anticorps-IgM et la coloration non spécifique du précipité d'IgM, simplifiant ainsi le diagnostique.

b) Taux élevé de Facteur Rhumatoïde ou d'immun-complexe.

Des échantillons présentant un taux élevé de Facteur Rhumatoïde ou d'immun-complexe peuvent former un précipité au point de dépôt. Une réduction de l'échantillon grâce au DTT ou β -2-mercaptoéthanol peut éliminer cette réaction non spécifique (Mélanger 190 μ L de dilution d'échantillon avec 10 μ L de 1% DTT en solution saline ou mélangeur 100 μ L de sérum pur avec 10 μ L de solution au 1/10 de β -2-mercaptoéthanol en solution. Réaliser l'IFE normalement.

NOTE: Toujours travailler sous hotte avec le β -2-mercaptoéthanol).

c) Fibrinogène.

Si le fibrinogène est présent dans l'échantillon, il peut apparaître sous forme d'une très fine bande dans toutes les cases de l'IFE. Le fibrinogène est présent dans le plasma, mais également se retrouver dans le sérum de patient sous anticoagulant.

3. Une réaction avec les chaînes Kappa ou Lambda sans correspondance avec les chaînes lourdes IgG, IgA ou IgM.

Les échantillons présentant cette réaction peuvent avoir une chaîne libre monoclonale ou une IgD ou IgE monoclonale. Dans cette situation, il est nécessaire de recommencer l'IFE en substituant les antiséras IgD et IgE à deux autres chaînes lourdes. Un défaut de réaction avec les antiséras IgD et IgE indiquera la présence d'une chaîne légère libre.

4. Une bande dans la région des gamma sans réaction avec les antiséras.

La protéine C réactive (CRP) peut être détectée chez les patients avec une réponse inflammatoire aiguë⁷⁸. La CRP apparaît comme une bande étroite en position cathodique du protéinogramme du patient. Une élévation de l'Alpha1-Antitrypsine et de l'Haptoglobine corrobore la présence de CRP. Les patients avec une bande CRP présente généralement un dosage élevé de CRP. Une bande étroite au niveau du point d'application peut parfois être due à la présence de chylomicrons dans le sérum ou à une précipitation des protéines due à la congélation.

5. Pas de réaction avec les chaînes légères Kappa ou Lambda.

Occasionnellement un échantillon peut présenter une absence de réponse en chaîne légère malgré la réponse en chaîne lourde. Dans ce cas, il convient d'éliminer a) Maladie des chaînes lourdes, b) Très forte concentration de chaînes légères, induisant un excès d'antigène, c) faible concentration de chaînes légères, d) chaînes légères atypiques ne réagissant pas avec les antiséras courants, e) chaînes légères avec des déterminants antigéniques "cachés" (souvent rencontré avec les IgA ou IgD). Pour obtenir un résultat définitif, il faut tester, a) des dilutions plus fortes ou plus faibles afin d'optimiser l'équivalence antigène / anticorps, b) des antiséras de plusieurs fabricants pour aider à l'identification de l'immunoglobuline atypique, et c) traiter le sérum au β -2-mercaptoéthanol afin de révéler les chaînes légères.

PERFORMANCES

Différents échantillons ont été réalisés et comparés avec un autre kit du commerce. Les résultats obtenus sur ces deux kits, montrent des résultats équivalents.

REACTIFS OPTIONELS

Réf. 9249 Antisérums anti IgD humaine

Réf. 9250 Antisérums anti IgE humaine

Réf. 9412 Antisérums chaîne légère libre Kappa

Réf. 9413 Antisérums chaîne légère libre Lambda

BIBLIOGRAPHIE

1. Afonso, E., 'Quantitation Immuno-electrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
2. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox Sang., 1969; 17 : 445-452.
3. Alper, C.A., 'Genetic Polymorphism of Complement Components as a Probe of Structure and Function', Progress in Immunology. First International Congress of Immunology. 1971 : 609-624, Academic Press, New York.
4. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of a1-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of PiM.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
5. Cawley, L.P., Minard, B.J., Tourtellotte, W.W., Ma, B.I. and Chelle, C. 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976; 22 : 1262-1268.
6. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
7. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B., and Franzén, B. 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.
8. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K., and Tyllia, M.M. 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

ANWENDUNGSBEREICH

Der SAS-MX IFE Kit dient zur Auftrennung und Identifizierung von monoklonalen Gammopathien durch Agarosegel- Elektrophorese in der Helena BioSciences SAS-MX Kammer.

Immunfixationselektrophorese (IFE) läuft in zwei Phasen ab. Die erste Phase verwendet Agarose-Elektrophorese in hoher Auflösung, gefolgt von Immunpräzipitation in der zweiten Phase.

Der größte Anwendungsbedarf für IFE liegt im klinischen Laborbereich, hier vor allem in der Diagnose von monoklonalen Gammopathien. Bei einer monoklonalen Gammopathie handelt es sich um eine Primärerkrankung, in der ein einzelner Klon von Plasmazellen vermehrt erhöhte Mengen von Immunglobulin einer einzelnen Klasse und eines einzelnen Types produziert. Solche Immunglobuline werden als monoklonale Proteine, M-Proteine oder Paraproteine bezeichnet. Ihre Anwesenheit kann von harmloser Natur oder unspezifischer Bedeutung sein. In manchen Fällen ist ihr Nachweis ein Hinweis auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung, wie dem multiplen Myelom oder Morbus Waldenström. Man muss zwischen polyklonalen und monoklonalen Gammopathien unterscheiden. Polyklonale Gammopathien sind sekundäre Erkrankungszustände, die durch chronische Lebererkrankungen, Kollagenosen, rheumatoide Arthritis und chronische Infektionen hervorgerufen werden.

Die Immunfixation wurde erstmals von Alfonso in der Literatur im Jahre 1964¹ beschrieben. Im Jahre 1969 veröffentlichten Alper und Johnson ein praktischeres Verfahren. Sie veröffentlichten eine Reihe von Studien, in denen dieses Vorgehen Anwendung fand^{2,4}. Immunfixation ist seit 1976 als Verfahren zur Untersuchung von Immunglobulinen im Einsatz^{3,6}.

Mit dem SAS-MX IFE Kit werden Serumproteine entsprechend ihrer Ladung im Agarosegel aufgetrennt. Die Proteine werden dann mit monospezifischen Antisera inkubiert, gewaschen und gefärbt, um die Immunausfällung zur qualitativen Beurteilung sichtbar zu machen.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien sind nur zur In-Vitro-Diagnostik bestimmt. Nicht einnehmen oder mit dem Mund pipettieren. Tragen von Handschuhen beim Umgang mit den Kit-Komponenten erforderlich. Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen zu den Komponenten, sowie die Informationen zur Entsorgung.

INHALT**1. SAS-MX IFE Gel**

Enthält Agarose in einem Tris-Barbital-Aspartat-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.

2. Tris-Barbital-Puffer

Enthält konzentrierten Tris-Barbital-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsstoff. Den Inhalt der Flasche vor dem Gebrauch zu 1 Liter mit dest. Wasser verdünnen und gut mischen.

3. Saures-Blau-Farbstoff

Enthält konzentrierte Saures-Blau-Farbstoff. Den Inhalt der Flasche mit 700ml dest. Wasser verdünnen. Über Nacht rühren und vor dem Gebrauch filtern. Lagerung des Farbstoffs in einer fest verschlossenen Flasche.

4. SAS-MX IFE Antiseren Kit

Enthält SP-Fixierlösung aus Essig- und Sulphosalicylsäure sowie monospezifische Antiseren gegen menschliche Immunglobuline, IgG, IgA, IgM sowie freie und gebundene Kappa- und Lambda-Leichtketten. Alle Antiseren enthalten Natriumazid als Konservierungsstoff. Die Antiseren sind gebrauchsfertig verpackt.

5. Entfärbelösung

Enthält 40ml konzentrierte Entfärbelösung. Den Inhalt jeder Flasche mit 2 Liter dest. Wasser verdünnen. Lagerung des Farbstoffs in einer fest verschlossenen Flasche.

6. Weitere Kit-Komponenten

Enthält eine Arbeitsanleitung sowie ausreichende Auftrageschablonen, Antiserenschablonen und Blotter A, B, C, D und X für 10 Gele.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. SAS-MX IFE Gel

Gele sollten bei 15...30°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. NICHT IM KÜHLSCHRANK ODER TIEFKÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN. Gele nicht mehr verwenden bei sichtbaren Anzeichen von Verfall: 1) Eine Kristallisation weist auf vorangegangenes Einfrieren hin, 2) Risse und Schälung weisen auf ein Austrocknen des Gels hin und 3) sichtbare Kontaminierung der Agarose durch Bakterien oder Pilze.

2. Tris-Barbital-Puffer

Das Pufferkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Pufferlösung ist für 2 Monate stabil bei einer Temperatur zwischen 15...30°C. Trübung oder schlechte Leistungsfähigkeit des verdünnten Puffers können auf eine Verschlechterung hinweisen.

3. Saures-Blau-Farbstoff

Das Farbstoff-Konzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Farbstofflösung ist für 6 Monate stabil bei einer Temperatur zwischen 15...30°C. Es wird empfohlen, den benutzten Farbstoff unverzüglich zu entsorgen, um eine Verminderung der Färbungsfähigkeit zu verhindern. Eine schlechte Einfärbungsleistung kann eine Verschlechterung der Färbungslösung andeuten.

4. SAS-MX IFE Antiseren Kit

Der Antiseren Kit sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Verunreinigung mit kleinen Teilchen oder Eintrübung kann auf eine Produktverschlechterung hindeuten.

5. Entfärbelösung

Das Entfärbekonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Entfärbelösung ist für 6 Monate stabil bei einer Temperatur zwischen 15...30°C. Trübung kann auf eine Verschlechterung der Entfärbelösung hinweisen.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 4063 SAS-MX Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS600 Netzteil

Kat. Nr. 9400 IFE Kontroll-Kit

Kat. Nr. 4062 Inkubationskammer

Kat. Nr. 9035 Immuno SuperPresse oder Kat. Nr. 5014 Entwicklungsgewicht

Ofen mit Umluft und einer Temperaturleistung von 70°C

Kochsalzlösung (0,85% NaCl)

Wasser

PROBENAHEME UND VORBEREITUNG

Frisches Serum ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Die Proben können gekühlt bis zu 72 Stunden bei 2...6°C oder 2 Wochen bei -20°C gelagert werden. Urin und Liquores können bei Einhaltung geeigneter Konzentrationsschritte ebenfalls verwendet werden:

Protein insgesamt (mg/dL)	Konzentrierungsfaktor
<50	100 x
50 - 100	50 x
100 - 300	25 x
300 - 600	10 x
600 - 1000	5 x

Diese konzentrierten Liquor- und Urinproben sollten unverdünnt auf dem Gel benutzt werden.

Serum vor Gebrauch mit physiologischer Kochsalzlösung (0.85%) im Verhältnis 1:2 (1+1) für die Kontrollspur (SP) und 1:10 (1+9) für die Immunfixationsspuren (G, A, M, K, L) verdünnen.

Bei der Typisierung von minimonoklonalen Banden, sollte es sich bei der Probe für die Immunglobulinreihen um unverdünntes Serum handeln.

Bei der Typisierung von monoklonalen Banden in hoher Konzentration, sollte die Probe für die Immunglobulinreihen mehr als 1+9 verdünnt werden, um eine Prozonierung zu verhindern.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. Nehmen Sie das Gel aus der Verpackung und legen Sie es auf ein Papiertuch. Entfernen Sie die Schutzfolie, blotten Sie kurz die Geloberfläche mit einem Blotter C und entfernen Sie diesen.
2. Legen Sie die Auftrageschablone so auf das Gel, dass die Pfeile am Rand des Gels liegen. Legen Sie einen Blotter A auf die Schablone und streichen Sie mit einem Finger über die Schlitze der Schablone, um eine gute Haftung sicherzustellen. Entfernen Sie den Blotter und legen Sie ihn bis zur Verwendung in Schritt 5 beiseite.
3. Pipettieren Sie 3µl der Probe in jeden Schablonenschlitz. 5 Minuten die Probe ins Gel diffundieren lassen.
4. Während die Probe einwirkt, füllen Sie 40ml Puffer in jeden der inneren Bereiche der SAS-MX-Kammer.
5. Drücken Sie nach den 5 Minuten den Blotter A aus Schritt 2 sanft auf die Schablone und entfernen Sie Schablone und Blotter.
6. Spannen Sie das Gel in die Kammer, Agarose nach oben, und achten Sie auf übereinstimmende Polarisierung (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer).

7. Trennen Sie das Gel: 25 Minuten, 120 Volt.
8. Legen sie das Gel nach abgeschlossener Elektrophorese in eine Inkubationskammer, die einen nassen Blotter enthält, und platzieren Sie die Antiserumaufragungsschablone auf die Geloberfläche. **BITTE BEACHTEN:** Stellen sie einen guten Kontakt zwischen Schablone und Gel her.
9. Pipettieren Sie 1 μ l der entsprechenden IFE-Kontrolle in die Vertiefungen des Gels. Gewähren sie eine vollständige Absorption von etwa drei Minuten nach Verschluss der Inkubationskammer.
10. Pipettieren Sie zwei Tropfen der Proteinfixierung in die SP-Spur und 2 Tropfen des entsprechenden Antiserums in die Immunglobulinreihen. Verteilen Sie das Antiserum gleichmäßig in der Spur (einschließlich Kontrollspur) durch wiederholtes Neigen des Gels.
11. Inkubieren sie das Gel für 10 Minuten bei 15...30°C.
12. Waschen sie die Antiserumschablone von der Geloberfläche nach der Inkubation kurz unter leichtem Schütteln des Gels in einer 0,9%en Kochsalzlösung.
13. Legen Sie das Gel auf einen Blotter D (Agarose nach oben!). Auf das Gel legen Sie einen mit Kochsalzlösung befeuchteten Blotter B, sowie anschließend einen Blotter X. Pressen Sie das Gel für 5 Minuten in einer IFE SuperPress. (Als Alternative können Sie für 10 Minuten ein normales Entwicklungsgewicht benutzen).
14. Entfernen Sie die Blotter und waschen Sie das Gel vorsichtig 4 Minuten lang in einer Kochsalzlösung.
15. Entnehmen Sie das Gel der Kochsalzlösung und legen Sie es mit der Agaroseseite nach oben auf einen Blotter D. Auf das Gel legen Sie einen mit Kochsalzlösung befeuchteten Blotter B, sowie anschließend einen Blotter D. Pressen Sie das Gel für 1 Minuten in einer IFE SuperPress (oder benutzen Sie für 3 Minuten ein Entwicklungsgewicht).
16. Entfernen Sie die Blotter und trocknen Sie das Gel bei 50...60°C.
17. Färben Sie das trockene Gel 4 Minuten in der Färbelösung.
18. Entfärben Sie das Gel in zwei jeweils 2 Minuten dauernden Waschvorgängen mit der Entfärbelösung.
19. Waschen Sie das Gel kurz unter Leitungswasser und trocknen Sie es bei 50...60°C.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die meisten monoklonalen Proteine wandern zur Kathode oder in den Gammabereich des Eiweißmusters. Sie können allerdings aufgrund ihrer pathologischen Eigenschaften während der Elektrophorese in jeden Bereich der Globulinregion wandern. Die monoklonale Eiweißbande auf dem Immunfixierungsmuster nimmt die gleiche Position und Gestalt an wie die pathologische Bande auf dem Serumweißmuster. Das pathologische Protein wird durch den Antiserumtyp, mit dem es reagiert, erkannt.

Geringe Konzentration an pathologischem Eiweiß kann dazu führen, daß die Bande nur sehr zart als Bestandteil des normalen polyklonalen Hintergrundes wahrgenommen werden kann. Bei starker polyklonaler Immunglobulinkonzentrationen können einzelne pathologische Banden überlagert werden. Im Zweifelsfall ist die Probe in höherer Verdünnung erneut zu analysieren.

Die Veröffentlichung 'Immunofixation for the Identification of Monoclonal Gammopathies' ist auf Anfrage bei Helena BioSciences erhältlich.

EINSCHRÄNKUNGEN**1. Antigenüberschuss**

Wenn es an der Ausfällungsstelle nicht zu einem leichten Antikörperüberschuss oder einem Antigen- Antikörperausgleich kommt, wird ein Antigenüberschuss auftreten. In der Regel ist ein Antigenüberschuss in IFE auf einen Überschuss von Immunglobulin in der Patientenprobe zurückzuführen. Antigenüberschuss ist durch das Prozenphenomen charakterisiert. Dabei kommt es zur Bildung von ungefärbten Arealen in der Mitte und gefärbten an den Rändern der immunfixierten Eiweißbande. Wenn dieses Phänomen auftritt, sollte eine stärker verdünnte Probe verwendet werden, damit die Immunglobulinkonzentration optimiert wird.

2. Unspezifische Ausfällung in allen Immunglobulinreihen

Gelegentlich zeigt eine fertige IFE-Platte eine Ausfällungsbande an der gleichen Stelle in jedem Muster über die Platte verteilt. Die Ursache dafür ist:

a) IgM monoklonale Immunglobuline. IgM monoklonale Proteine können sich an die Gel-Matrix anheften. Als Folge davon erscheint eine Bande in fünf Antiserumreihen des Gels. Wo die Bande allerdings mit einem spezifischen Antiserum für schwere und leichte Ketten reagiert, vergrößert sich die Bande und ihre Färbungsintensität, wodurch der Immunglobulintyp erkennbar wird.

Die Diagnose wird weiterhin vereinfacht, indem die Probe weiter verdünnt wird, wodurch die Unterscheidung zwischen der IgM Antikörper Reaktion und der unspezifischen Färbung des ausgefallenen IgM Proteins in den anderen Reihen verbessert wird.

b) Hohe Rheumafaktoren-Titer oder Immunkomplexe. Proben mit hohen Rheumafaktoren-Titern oder anderen Immunkomplexen können am Probenauftragungsort eine Ausfällungsbande anzeigen. Reduktion der Probe mit DTT oder β -2-Mercaptoethanol kann diese unspezifische Reaktion verhindern. (Vermischen Sie 190 μ L Serum mit 10 μ L DTT 1% in einer 0,85% Kochsalzlösung, oder mischen Sie 100 μ L Serum mit 10 μ L einer 1:10 verdünntem Lösung β -2-Mercaptoethanol in Wasser). Führen Sie die IFE wie gewohnt durch. Bitte beachten: Beim Umgang mit β -2-Mercaptoethanol immer unter der Abzugshaube arbeiten.

c) Fibrinogen. Wenn sich Fibrinogen in der Probe befindet, zeigt sich das als schwache Bande in allen Reihen des Immunglobulinmusters. Fibrinogen befindet sich im Plasma und manchmal im Serum von Patienten unter Anticoagulanttherapie.

3. Reaktion mit Kappa- oder Lambda-Leichtketten-Antisera, aber keine Reaktion mit IgG, IgA oder IgM Schwereketten-Antisera.

Proben, die dieses Verhalten zeigen, haben entweder eine freie Leichtketten (monoklonale) Gammopathie oder eventuell ein IgD oder IgE monoklonales Protein. Unter diesen Umständen sollte die IFE unter Einsatz von IgD- und IgE-Antisera oder Verwendung von Antisera gegen freie Kappa und Lambda Leichtketten wiederholt werden. Falls es nicht zur Reaktion mit IgD- oder IgE-Antisera kommt, kann dies ein Hinweis für eine Leichtkettengammopathie sein.

4. Die Bande in der Gamma-Region zeigt keine Reaktion mit den IFE-Antisera.

C reaktives Protein (CRP) kann bei Patienten mit akuten Entzündungsprozessen gefunden werden^{7,8}. Das C reaktive Protein erscheint am Kathodenende des Serumproteinmusters als schmales Band. Erhöhte Alpha-1-Antitrypsin- und Haptoglobinwerte weisen ebenfalls auf die Anwesenheit von CRP hin. Patienten, die eine CRP-Bande aufweisen, haben in der Regel ein erhöhtes CRP. Manchmal sieht man eine schmale Bande am Punkt der Probenauftragung. Diese kann durch Chylomikronen im Serum oder aber durch ausgefallenes Eiweiß in Proben, die gefroren gelagert wurden, verursacht sein.

5. Keine Reaktion mit Kappa- und Lambda-Antiseren.

Gelegentlich reagiert eine Probe mit dem Antiserum einer schweren Kette, wenn keine Reaktion mit einer leichten Kette erkennbar ist. In dieser Situation muss folgendes ausgeschlossen werden: a) Schwerkettenkrankheit, b) sehr hohe Leichtkettenkonzentrationen, die zu einem Antigenüberschuss führen, c) eine niedrige Konzentration der leichten Ketten, d) ein atypisches Leichtkettenmolekül, das nicht mit dem Antiserum reagiert, e) leichte Ketten mit 'versteckten' Leichtkettendeterminanten (manchmal bei IgA und IgD zu finden). Um definitive Resultate zu erzielen, sollten die Tests folgendes einschließen: a) eine stärkere oder schwächere Verdünnung der Probe, um das Antikörper-Antigen-Gleichgewicht zu optimieren, b) Verwendung von Antiseren verschiedener Hersteller, um die Erkennung von atypischen Antikörpern zu gewährleisten, c) Behandeln Sie die Probe mit β -2-Mercaptoethanol, um die leichten Ketten 'aufzudecken'.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Eine Anzahl Proben wurden mit dieser Methode und einem anderen kommerziell erhältlichen Testkit analysiert und die erhaltenen Meßwerte verglichen. Beide Methoden liefern übereinstimmende Resultate.

OPTIONAL ERHÄLTICHE ANTISEREN

Kat. Nr. 9249 Antiserum gegen menschliches IgD

Kat. Nr. 9250 Antiserum gegen menschliches IgE

Kat. Nr. 9412 Antiserum gegen menschliche freie Kappa-Leichtketten

Kat. Nr. 9413 Antiserum gegen menschliche freie Lambda-Leichtketten

LITERATUR

1. Alfonso, E., 'Quantitation Immuno-electrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
2. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vo. Sang., 1969; 17 : 445-452.
3. Alper, C.A., 'Genetic Polymorphism of Complement Components as a Probe of Structure and Function', Progress in Immunology. First International Congress of Immunology. 1971 : 609-624, Academic Press, New York.
4. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of Alpha(1)-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of P.M.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
5. Cawley, L.P. et al. 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976; 22 : 1262-1268.
6. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
7. Jeppsson, J.E. et al., 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.
8. Killingsworth, L.M. et al., 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

PRINCIPIO

Il kit SAS-MX Immunofix è stato formulato per la separazione ed identificazione delle gammopatie monoclonali mediante elettroforesi proteica su gel di agarosio, eseguita con camera elettroforetica Helena BioSciences.

L'immunofissazione (IFE) è una procedura che avviene in 2 passaggi: inizialmente viene eseguita un elettroforesi ad alta risoluzione, successivamente avviene l'immunoprecipitazione.

La maggior parte delle richieste di IFE è nei laboratori clinici, dove viene impiegata essenzialmente per la determinazione delle gammopatie monoclonali. La gammopatia monoclonale è una malattia in cui un singolo clone di cellule plasmatiche produce elevati livelli di immunoglobuline di una singola classe e tipo. Tali immunoglobuline sono identificate come proteine monoclonali o paraproteine. La loro presenza può essere di natura benigna oppure di incerto significato. In alcuni casi sono indicativi di tumori maligni come mielomi multipli o la macroglobulinemia di Waldenström's. Bisogna differenziare le gammopatie policlonali da quelle monoclonali. Le gammopatie policlonali sono il secondo stato di malattie dovute a disordini clinici come l'epatopatia cronica, disordini del collagene, reumatismi, artriti e infezioni croniche.

Alfonso è stato il primo a descrivere l'immunofissazione in letteratura nel 1964¹. Alper e Johnson pubblicarono molte procedure nel 1969 e pubblicarono i loro studi utilizzando questa tecnica dal 1972 al 1974^{2,4}. L'immunofissazione è stata impiegata come procedura di investigazione di immunoglobulinemie nel 1976^{5,6}.

Il kit SAS-MX IFE separa le sieroproteine in base alla loro carica elettrica in gel di agarosio. Le proteine vengono quindi incubate con l'antisiero monospecifico, lavate e colorate. Al termine si visualizza l'immunoprecipitato.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti sono solo per uso diagnostico in vitro. Non ingerire o pipettare con la bocca alcun componente del kit. Indossare i guanti quando si maneggiano i componenti del kit. Riferirsi alle schede tecniche e dati di sicurezza per le avvertenze sui componenti del kit.

COMPOSIZIONE**1. Piastre SAS-MX IFE**

Contengono agarosio in tampone Tris barbital / aspartato con sodio azide come conservante. Il gel è pronto per l'uso.

2. Tampone Tris / barbital concentrato

Contiene tampone concentrato Tris / barbital con sodio azide aggiunto come conservante. Diluire l'intero contenuto del bottiglia a 1 litro con acqua distillata e miscelare bene.

3. Colorante Acido Blu concentrato

Contiene colorante Acido Blu. Diluire l'intero contenuto del bottiglia con 700ml di acqua distillata. Agitare tutta la notte e filtrare prima dell'uso. Conservare in bottiglia chiusi.

4. Set antisieri SAS-MX IFE**Contenente:**

- un fissante proteico, costituito da una soluzione di acido solfosalicilico e acido acetico.
- antisieri monospecifici contro le immunoglobuline umane IgG, A, M.
- catene leggere umane kappa e lambda (libere e legate).

Tutti gli antisieri contengono sodio azide come conservante. Gli antisieri sono pronti all'uso.

5. Soluzione decolorante

Ciascun bottiglia contiene 40ml di soluzione decolorante concentrata. Diluire l'intero bottiglia in 2L di acqua distillata (20ml+ 980 ml per 1L di soluzione). Conservare in bottiglia chiusi.

6. Altri componenti del Kit

Ogni kit contiene inoltre un foglio procedurale, bibule, blotter A, B, C, D, X, mascherine di applicazione sieri, mascherine di applicazione antisieri, in quantità sufficiente per 10 piastre di gel.

CONSERVAZIONE E STABILITA'

1. Piastre SAS-MX IFE

Il gel deve essere conservato a 15...30°C, e sono stabile fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. **NON REFRIGERARE O CONGELARE.** Il deterioramento del gel può essere indicato da: 1) La presenza di cristalli sulla superficie dovuta al congelamento; 2) Rottura o assottigliamento del gel dovuti all'asciugatura; 3) Contaminazione visibile da parte di batteri o funghi sporigeni.

2. Tampone tris-barbital

Il tampone concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza indicata sull'etichetta. Il tampone diluito è stabile per due mesi a 15...30°C. Torbidità o scarsa risoluzione delle bande indicano il deterioramento.

3. Acido Blu

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza indicata sull'etichetta. Il colorante diluito è stabile per 6 mesi a 15...30°C. Una scarsa colorazione indica il deterioramento.

4. Set Antisieri SAS-MX IFE

Il Kit degli antisieri deve essere conservato a 2...6°C, sono stabili fino a data di scadenza indicata sull'etichetta. Particelle in sospensione o torbidità indicano il loro deterioramento.

5. Soluzione Decolorante

La soluzione decolorante concentrata deve essere conservata a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza indicata sull'etichetta. Diluito è stabile 6 mesi a 15...30°C, la presenza di torbidità indica il deterioramento del decolorante.

MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

Cod. 4063 Camera di migrazione

Cod. 1525 EPS Alimentatore

Cod. 9400 Controllo IFE

Cod. 4062 Camera di incubazione

Cod. 9035 o Cod. 5014 Immunopressa o peso di sviluppo

Forno ad aria forzata con temperature fino a 70°C

Soluzione fisiologica 0.85% NaCl

Acqua depurata

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Si consiglia di utilizzare siero, urine, liquido cerebrospinale freschi. I campioni si possono comunque conservare refrigerati a 2...6°C con aggiunta di azoturo di sodio allo 0.1% per 72 ore o 2 settimane a -20°C.

Urine e CSF possono essere utilizzate secondo queste concentrazioni:

TOTAL PROTEIN	CONC. FATTORE
<50	100X
50 - 100	50X
100 - 300	25X
300 - 600	10X
600 - 1000	5X

I campioni di siero devono essere diluiti con soluzione fisiologica:

- I + I per il tracciato di riferimento SP
- I +9 per tutte 5 le immunoglobuline

Se la concentrazione delle immunoglobuline risulta troppo bassa non diluire il siero.

Se la concentrazione delle immunoglobuline risulta troppo elevata diluire ulteriormente il campione per evitare l'effetto prozona.

PROCEDURA

1. Estrarre la piastra di gel dalla confezione, collocarla su una bibula, rimuovere il film protettivo e asciugare la superficie del gel con un blotter C; scartare il blotter.
2. Applicare la mascherina di semina allineandola con i punti laterali del gel. Collocare sopra la mascherina un blotter A ed esercitare una leggera pressione su tutte le fessure per assicurare un buon contatto. Rimuovere il blotter e conservarlo per il passaggio 5.
3. Applicare 3µl di campione nelle relative fessure di semina e lasciare assorbire per 5 minuti.
4. Durante l'assorbimento, collocare 40ml di tampone in ogni compartimento interno della camera di elettroforesi. Coprire la camera fino al momento dell'uso.
5. Dopo l'assorbimento del campione, asciugare leggermente la mascherina con il blotter A, conservato dal passaggio 2, quindi eliminare mascherina e blotter.
6. Collocare la piastra all'interno della camera con il gel verso l'alto e allineando il lato positivo + e negativo - corrispondenti alle posizioni della camera.
7. Sottoporre il gel ad elettroforesi a: 120 V, 25-30 minuti.
8. Al termine dell'elettroforesi, collocare la piastra con l'agar rivolto verso l'alto, in un camerina di incubazione contenente una bibula inumidita. Applicare la mascherina per gli antisieri sulla piastra di gel, facendola combaciare con le finestre prestampate sulla piastra. **NOTA:** imprimere una leggera pressione con le dita per tutta la mascherina per assicurare un buon contatto.
9. Applicare 1µl dell'opportuno controllo IFE nei pozzetti presenti sul gel. Chiudere la camerina e lasciare assorbire completamente (circa 3 minuti).
10. Applicare 2 gocce di Fissante proteico nella finestra SP e 2 gocce degli antisieri specifici, in ognuna delle relative finestre già contrassegnate. Quindi assicurare un contatto ottimale dell'antisiero per tutta la finestra facendo ruotare opportunamente il gel.
11. Incubare in camera umida a temperatura ambiente 15...30°C per 10 minuti.

12. Al termine dell'incubazione rimuovere la mascherina degli antisieri, e lavare il gel brevemente in fisiologica per rimuovere l'eccesso di antisiero.
13. Collocare il gel su un blotter D con l'agarosio rivolto verso l'alto. Porre un blotter B, inumidito in fisiologica, sulla superficie del gel e subito dopo un blotter X.
Premere il gel con la SuperPress IFE per 5 minuti. (In alternativa, usare il Peso di Sviluppo per 10 minuti).
14. Rimuovere quindi peso e blotter e collocare il gel in una vaschetta contenente fisiologica per 4 minuti agitando lentamente.
15. Rimuovere il gel dalla fisiologica, collocarlo su un blotter D con l'agarosio verso l'alto. Porre un blotter B inumidito in fisiologica sulla superficie del gel seguito da un blotter D. Premere per 1 minuto con la SuperPress (o 3 minuti se si usa il peso di sviluppo).
16. Rimuovere peso e blotter, asciugare il gel a 50...60°C.
17. Colorare il gel asciutto, per 4 minuti in Acido blu.
18. Decolorare il gel in due bagni di soluzione decolorante per 2 minuti ciascuno.
19. Sciacquare velocemente il gel con acqua e asciugare il gel a 50...60°C.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La maggior parte delle proteine monoclonali migra nella zona catodica (gamma) del tracciato proteico, in quanto anomale possono migrare ovunque nel tracciato.

Nel tracciato immunofissato, la banda monoclonale occuperà la stessa posizione di migrazione e avrà la stessa conformazione della corrispondente banda monoclonale del tracciato di riferimento. La proteina patologica viene fissata dall'antisiero corrispondente che viene utilizzato.

Dove sono presenti basse concentrazioni di proteine patologiche, le bande possono apparire senza le normali immunoglobuline policlonali.

La pubblicazione "IMMUNOFIXATION FOR THE IDENTIFICATION OF MONOCLONAL GAMMOPATHIES" è disponibile dal Helena BioSciences, su richiesta.

LIMITI

1. Eccesso di antigene.

Solitamente nelle IFE l'eccesso di antigene è dovuto per l'elevata concentrazione delle immunoglobuline nel campione del paziente. Si evidenzia come una mancanza di colore al centro della banda immunofissata che risulta invece più colorata ai margini. Questo viene identificato come prozona. In tal caso si rende necessario aumentare la diluizione del campione.

2. Precipitazione non-specifica in tutte le finestre di immunoglobuline.

Occasionalmente le piastre di IFE presentano delle bande di precipitazione nella stessa posizione in tutte le finestre.

Questo può essere causato da:

a) IgM monoclonali che aderiscono alla matrice di gel comparando in tutte e cinque le reazioni anticorpali.

Dove però l'immunoglobulina reagisce con l'antisiero specifico sia per le catene pesanti che per le leggere. La banda risulta più netta e colorata delle altre, facilitandone così l'identificazione. Aumentando la diluizione si migliora la distinzione tra la reazione specifica degli anticorpi delle IgM, dalle altre non specifiche.

b) Alta titolazione di Fattori reumatoidi o Immunocomplessi

Campioni con alto titolo di fattori reumatoidi o di immunocomplessi possono mostrare un precipitato nel punto di applicazione. Questa reazione non specifica si può eliminare riducendo il campione con DTT o β -2 mercaptoetanolo (Miscelare 190 μ l di siero diluito con 10 μ l di soluzione al 1% di DTT, preparata con soluzione fisiologica allo 0.85% o miscelare 100 μ l di siero con 10 μ l di una soluzione di β -2 mercaptoetanolo diluita 1:10 con acqua.

c) Fibrinogeno.

Se il fibrinogeno è presente nel campione analizzato si avranno delle bande in tutte le finestre. Solitamente è presente nei pazienti in terapia anticoagulante.

3. Reazioni in Kappa e Lamda ma non nelle catene pesanti.

I campioni in cui si verifica questa situazione possono avere catene libere e leggere (gammopatia monoclonale) o possono avere proteine monoclonali IgD o IgE. In questo caso ripetere l'immunofissazione sostituendo gli antisieri IgD e IgE agli antisieri delle catene pesanti (IgG/A/M). Se non si hanno reazioni di precipitazione si può parlare di malattie delle catene leggere.

4. Banda in regione gamma senza reazione con antisieri specifici.

Si verifica in pazienti che hanno il valore di Proteina C (CRP) elevato, per pazienti che presentano dei chilomicroni nel siero o in campioni che sono stati congelati.

5. Antisieri che non reagiscono con Kappa e Lambda.

In questo caso bisogna eliminare: a) le catene pesanti; b) alte concentrazioni di catene leggere per evitare un eccesso di antigene; c) basse concentrazioni di catene leggere; d) atipiche molecole di catene leggere che non reagiscono con gli antisieri; e) catene leggere con nascoste catene leggere determinanti (come a volte si vede con IgA e IgD). Per ottenere un risultato definitivo puoi includere nel test: a) alte o basse diluizioni del campione per ottimizzare l'equivalenza tra anticorpo e antigene; b) l'utilizzo di antisieri più specifici per l'identificazione di immunoglobuline atipiche e c) trattare il campione con β -2-mercaptoetanolo per rilevare le catene leggere.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Una serie di campioni sono stati testati e comparati con altri kit disponibili in commercio - entrambi i kits hanno mostrato risultati equivalenti.

MATERIALE OPZIONALE

Cod. 9249 Antisiero IgD

Cod. 9250 Antisiero IgE

Cod. 9412 Antisiero catene leggere Kappa libere

Cod. 9413 Antisiero catene leggere Lamda libere

BIBLIOGRAFIA:

1. Afonso, E., 'Quantitation Immunoelectrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
2. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox Sang., 1969; 17 : 445-452.
3. Alper, C.A., 'Genetic Polymorphism of Complement Components as a Probe of Structure and Function', Progress in Immunology. First International Congress of Immunology. 1971 : 609-624, Academic Press, New York.
4. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of α 1-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of PiM.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.

5. Cawley, L.P., Minard, B.J., Tourtellotte, W.W., Ma, B.I. and Chelle, C. 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976; 22 : 1262-1268.
6. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
7. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B., and Franzén, B. 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.
8. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K., and Tyllia, M.M. 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

USO PREVISTO

El kit IFE de SAS-MX tiene como objeto la separación e identificación de gammapatías monoclonales por electroforesis con gel de agarosa en la cámara de electroforesis SAS-MX de Helena BioSciences.

La inmunofijación (IFE) es un procedimiento en dos etapas aplicando electroforesis en agarosa de alta resolución en la primera etapa e inmunoprecipitación en la segunda.

La mayor demanda de IFE se da en los laboratorios clínicos, donde es utilizada principalmente para la detección de gammapatías monoclonales. Una gammapatía monoclonal es un estado de enfermedad primario en el que un solo clon de células de plasma produce elevados niveles de una inmunoglobulina de una sola clase y tipo. Tales inmunoglobulinas son conocidas como proteínas monoclonales, proteínas M o paraproteínas. Su presencia puede ser de naturaleza benigna o tener un significado incierto. En algunos casos, son de naturaleza maligna, como el mieloma múltiple o la macroglobulinemia de Waldenström. Hay que establecer una diferencia entre gammapatías policlonales y monoclonales, ya que las gammapatías policlonales son un estado de enfermedad secundario debido a desórdenes clínicos tales como enfermedad crónica del hígado, desórdenes de colágenos, artritis reumatoide e infecciones crónicas.

Alfonso fue el primero en describir la inmunofijación en la literatura, en 1964¹. Alper y Johnson publicaron un procedimiento más práctico en 1969 y luego publicaron varios estudios utilizando esta técnica^{2,4}. La inmunofijación ha estado siendo utilizada como procedimiento para la investigación de inmunoglobulinas desde 1976^{5,6}.

El kit IFE de SAS-MX separa las seroproteínas según la carga en un gel de agarosa. Luego las proteínas son incubadas con antisuero monoespecífico, lavadas y coloreadas para permitir la visualización del inmunoprecipitado para obtener una interpretación cualitativa.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todos los reactivos son para utilizar únicamente en diagnósticos in vitro. No ingerir ni aspirar por la boca ningún componente del kit. Utilizar guantes para manipular los componentes del kit. Consultar en el prospecto de seguridad del producto las indicaciones sobre riesgos y seguridad así como la información acerca de su eliminación.

COMPOSICION**1. Gel IFE SAS-MX.**

Contiene agarosa en un tampón de tris / barbital / aspartato, con sodio ácido como conservante. El gel viene envasado listo para usar.

2. Tampón Tris / Barbital concentrado.

Contiene un concentrado tampón de tris / barbital con un de sodio ácido añadido como conservante. Diluir el contenido del frasco a 1 litro con agua destilada y mezclar bien.

3. Colorante azul ácido concentrado.

Contiene colorante azul ácido concentrado. Diluir el contenido del frasco en 700ml de agua purificada. Dejar agitando durante toda la noche y filtrarlo antes del uso. Guardar el colorante en un frasco herméticamente cerrado.

4. Kit de antisuero IFE SAS-MX.

Contiene un fijador de proteínas SP (conteniendo ácido acético y ácido sulfosalicílico) y antisuero monoespecífico para inmunoglobulinas humanas - IgG, IgA, IgM, cadenas ligeras kappa (libre y combinada) y cadenas ligeras lambda (libre y combinada). Todos los antisueros contienen de acida de sodio como conservante. El antisuero viene envasado listo para usar.

5. Solución Decolorante Concentrado.

Cada frasco contiene 40ml de solución decolorante concentrada. Diluir el contenido de cada frasco en 2 litros de agua destilada. Guardar el colorante en un frasco herméticamente cerrado.

6. Otros componentes del kit.

Cada kit contiene una hoja de instrucciones y suficientes plantillas de aplicación de muestras, plantillas para antisueros y secantes tipo A, B, C, D y X, hasta completar 10 geles.

ALMACENAMIENTO Y PERIODO DE VALIDEZ

1. Gel IFE SAS-MX.

Los geles deben guardarse a una temperatura entre 15...30°C y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. NO REFRIGERAR NI CONGELAR. El deterioro del gel puede ser indicado por: 1) aspecto cristalino, indicio de que el gel se ha congelado, 2) agrietamiento y exfoliación, indicio de que el gel se ha secado, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

2. Tampón de Tris / Barbital.

El tampón concentrado debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El tampón diluido es estable durante 2 meses a una temperatura entre 15...30°C. Turbidez o un mal comportamiento de la concentración tampón diluida pueden ser indicios de deterioro.

3. Colorante azul ácido.

El colorante concentrado debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. La solución colorante diluida es estable durante 6 meses a una temperatura entre 15...30°C. Es aconsejable desechar inmediatamente el colorante usado para prevenir el agotamiento de su capacidad de coloración. Unos malos resultados de coloración pueden ser indicio de deterioro.

4. Kit de antisuero IFE SAS-MX.

El kit de antisuero debe guardarse a una temperatura entre 2...6°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Turbiedad o contaminación por partículas pueden ser indicios de deterioro.

5. Solución decolorante.

El decolorante concentrado debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. La solución decolorante diluida es estable durante 6 meses a una temperatura entre 15...30°C. La aparición de turbiedad puede ser indicio de deterioro.

ARTICULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- nº de catálogo 4063 Cámara SAS-MX
- nº de catálogo 1525 Fuente de alimentación EPS600
- nº de catálogo 9400 Kit de control IFE
- nº de catálogo 4062 Cámara de Incubación
- nº de catálogo 9035 Inmuno SuperPress o nº de catálogo 5014 peso de laboratorio
- Horno con aire a presión capaz de alcanzar 70°C
- Solución salina (NaCl 0,85%)
- Agua destilada

RECOGIDA Y PREPARACION DE MUESTRAS

La muestra consistirá en suero recién obtenido. Las muestras se pueden guardar refrigeradas a una temperatura entre 2...6°C hasta 72 horas, o 2 semanas a -20°C. Orina y CSF también se pueden usar siguiendo una fase de concentración adecuada:

Proteínas totales (mg/dL)	Factor de concentración
< 50	100 x
50 - 100	50 x
100 - 300	25 x
300 - 600	10 x
600 - 1000	5 x

Estas muestras concentradas de CSF y orina deben utilizarse puras, sin mezclar, en el gel.

Las muestras de suero se utilizarán diluidas 1 + 1, en la calle SP, y en una proporción 1 + 9 con solución salina para las 5 calles de inmunoglobulinas.

Al investigar bandas minimonoclonales, la muestra para las calles de inmunoglobulinas deben ser suero sin diluir.

Al investigar bandas monoclonales de concentración de elevada, la muestra para las calles de inmunoglobulinas debe estar diluida en una proporción mayor de 1 + 9 para prevenir la aparición de efectos de zona.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Sacar el gel del envase y colocarlo sobre una toallita de papel. Quitar la lámina protectora y secar la superficie del gel con un secante C; luego desechar el secante.
2. Alinear la plantilla de aplicación de la muestra con las flechas existentes en el borde del gel. Colocar un secante A encima de la plantilla y frotar con un dedo a lo largo de las hendiduras para asegurar un buen contacto. Retirar el secante y conservarlo para utilizarlo luego en el paso 5.
3. Aplicar 3µl de la muestra a cada hendidura y dejar que sea absorbida durante 5 minutos.
4. Mientras las muestras son absorbidas, verter 40ml del tampón en cada hueco interior de la cámara SAS-MX.
5. Tras la absorción de la muestra, secar ligeramente la plantilla con el secante A conservado desde el paso 2 y luego retirar el secante y la plantilla.
6. Colocar el gel en la cámara con la agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo (+) y negativo (-) con las posiciones correspondientes en la cámara.
7. Aplicar la electroforesis al gel: 120 V, 25 minutos.

8. Al finalizar la electroforesis, colocar el gel en una cámara de incubación conteniendo un secante húmedo y situar la plantilla de aplicación del antisuero sobre la superficie del gel. **NOTA:** Asegurar un buen contacto entre plantilla y gel.
9. Aplicar 1µl del kit de control IFE correspondiente a las cavidades del gel. Cerrar la cámara de incubación y esperar a que la absorción sea completa (aproximadamente 3 minutos).
10. Aplicar 2 gotas del fijador de proteínas a la línea SP y 2 gotas del antisuero correcto a las calles de inmunoglobulinas. Asegurar una distribución uniforme del antisuero en la línea (incluyendo las cavidades de control) balanceando el gel.
11. Incubar el gel a una temperatura entre 15...30°C durante 10 minutos.
12. Al finalizar la fase de incubación, remover la plantilla de antisuero lavando el gel brevemente en solución salina 0.9% ClNa, agitando suavemente.
13. Colocar el gel en un secante D con la agarosa hacia arriba. Colocar un secante B (humedecido en solución salina) sobre el gel y a continuación un secante X. Presionar el gel en una SuperPress IFE durante 5 minutos. (Como alternativa, se puede utilizar un peso de desarroyo durante 10 minutos).
14. Quitar los secantes y colocar el gel en una solución salina durante 4 minutos, agitando suavemente.
15. Retirar el gel de la solución salina y colocarlo sobre un secante D con la agarosa hacia arriba. Poner un secante B (humedecido en la solución salina) sobre la superficie del gel y a continuación un secante D. Presionar el gel en una SuperPress IFE durante 1 minuto (o utilizar un peso de desarroyo durante 3 minutos).
16. Retirar los secantes y secar el gel a una temperatura de 50...60°C.
17. Sumergir el gel seco en la solución colorante durante 4 minutos.
18. Decolorar el gel mediante 2 lavados de 2 minutos cada uno con la solución decolorante.
19. Lavar brevemente el gel con agua y secar a 50...60°C.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

La mayoría de las proteínas monoclonales migran en la región gamma, catódica, del patrón proteínico, aunque debido a su naturaleza anormal pueden migrar a cualquier lugar dentro de la región globulínica durante la electroforesis proteínica. La banda proteínica monoclonal en el patrón de inmunofijación ocupará la misma posición y forma que la banda anormal en el patrón seroproteínico. La proteína anormal es identificada por la forma en que reacciona con ella el tipo de antisuero específico.

Cuando existen bajas concentraciones de proteínas anormales, la banda anormal puede aparecer como una banda dentro de la inmunoglobulina policlonal normal. También se puede observar una banda dentro de un fondo policlonal cuando también se da una fuerte presencia de inmunoglobulina policlonal.

Bajo pedido, Helena Biosciences puede suministrar la publicación 'Immunofixation for the Identification of Monoclonal Gammopathies'.

LIMITACIONES**1. Exceso de antígeno.**

Se produce un exceso de antígeno cuando no hay anticuerpos ligeramente en exceso o una equivalencia antígeno / anticuerpo en el lugar de la precipitación. El exceso de antígeno en IFE suele deberse a un exceso de inmunoglobulina en la muestra del paciente. El exceso de antígeno está caracterizado por la aparición de efectos de zona (zonas sin colorear en el centro de la banda proteínica inmunofijada, con coloración alrededor de los bordes). En este caso, deberá utilizarse una dilución mayor de la muestra para optimizar la concentración de inmunoglobulina.

2. Precipitación no específica en todas las líneas de inmunoglobulinas.

De vez en cuando, una placa IFE terminada exhibe una banda de precipitado en la misma posición en cada una de las calles de la placa. Esto puede ser el resultado de:

a) Inmunoglobulinas monoclonales IgM.

Las proteínas monoclonales IgM se pueden adherir a la matriz del gel. En 5 de las líneas de antisuero del gel aparecerá una banda. Sin embargo, donde la banda reacciona con un antisuero específico tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera, habrá un incremento en el tamaño y en la intensidad de coloración de la banda, permitiendo identificar el tipo de inmunoglobulina. La dilución adicional de la muestra permitirá mejorar la discriminación entre la reacción del anticuerpo IgM y la coloración no específica de la proteína IgM precipitada en las otras líneas, simplificando el diagnóstico.

b) Altas concentraciones de FR o complejos inmunes.

Las muestras con altas concentraciones de factor reumatoide (FR) u otros complejos inmunes pueden mostrar una banda de precipitado en el punto de aplicación de la muestra. Reduciendo la muestra con DTT o β -2-mercaptoetanol se puede eliminar esta reacción no específica (mezclar 190 μ l de suero diluido con 10 μ l de un 1% (w/v) de DTT en un 0,85% de solución salina, o mezclar 100 μ l de suero con 10 μ l de una dilución 1:10 de β -2-mercaptoetanol en agua. Ejecutar el IFE de la forma usual. **NOTA:** trabajar siempre en una campana de humos cuando se utilice el β -2-mercaptoetanol).

c) Fibrinógeno.

El fibrinógeno, cuando está presente en la muestra, mostrará una especie de banda discreta en todas las líneas del patrón de inmunofijación. El fibrinógeno está presente en el plasma y, algunas veces, en el suero de pacientes a los que se está aplicando una terapia anticoagulante.

3. Reacción con la cadena ligera de antisuero kappa o lambda, pero no reacción con la cadena fuerte de antisuero IgG, IgA o IgM.

Las muestras que presentan este patrón pueden tener una gammapatía monoclonal de cadena ligera libre o bien una proteína monoclonal IgD o IgE. En este caso, deberá repetirse la IFE, sustituyendo el antisuero IgD e IgE por dos de los otros antisueros de cadena pesada. El fracaso en la obtención de una reacción con antisuero IgD o IgE será un indicio de enfermedad de cadena ligera libre.

4. Banda en la región gamma sin mostrar reactividad con antisuero IFE.

La proteína C reactiva (PCR) puede ser detectada en pacientes con una respuesta inflamatoria aguda^{7a}. La PCR aparece en forma de banda estrecha en el extremo catódico del patrón de la seroproteína. Concentraciones elevadas de alfa₁-antitripsina y haptoglobina son una clara evidencia de PCR. Los pacientes con una banda de PCR tendrán probablemente un elevado nivel al realizar los análisis de PCR. A veces, puede ser vista una banda estrecha en el punto de aplicación de la muestra, que puede estar causada por quilomicrones en el suero o proteínas precipitadas en muestras que se han guardado congeladas.

5. No reactividad con antisuero kappa y lambda.

A veces, una muestra tendrá una reacción con un antisuero de cadena pesada, pero no una reacción de cadena ligera, obviamente. En tal caso, será necesario descartar las siguientes posibilidades: a) enfermedad de cadena pesada, b) concentraciones muy altas de cadenas ligeras, conduciendo a un efecto de zona por exceso de antígeno, c) bajas concentraciones de cadenas ligeras, d) molécula atípica de cadena ligera que no reacciona con el antisuero, e) cadenas ligeras con determinantes de cadenas ligeras "ocultos" (como se ven a veces con IgA e IgD). Para obtener unos resultados definitivos, el ensayo puede incluir: a) una mayor o menor dilución de la muestra para optimizar la equivalencia anticuerpo / antígeno, b) antisuero de otros fabricantes para ayudar en la identificación de inmunoglobulinas atípicas y c) tratar la muestra con β -2-mercaptoetanol para "revelar" las cadenas ligeras.

CARACTERISTICAS FUNCIONALES

Se probó una serie de muestras, y al compararla con otro kit comercial disponible, ambos presentaron resultados equivalentes.

MATERIALES EXTRA OPCIONALES

nº de catálogo 9249 Antisuero IgD humano

nº de catálogo 9250 Antisuero IgE humano

nº de catálogo 9412 Antisuero cadena ligera libre kappa humana

nº de catálogo 9413 Antisuero cadena ligera libre lambda humana

BIBLIOGRAFIA

1. Afonso, E., 'Quantitation Immuno-electrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
2. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox Sang., 1969; 17 : 445-452.
3. Alper, C.A., 'Genetic Polymorphism of Complement Components as a Probe of Structure and Function', Progress in Immunology. First International Congress of Immunology. 1971 : 609-624, Academic Press, New York.
4. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of a I-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of PiM.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
5. Cawley, L.P., Minard, B.J., Tourtellotte, W.W., Ma, B.I. and Chelle, C. 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976; 22 : 1262-1268.
6. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
7. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B., and Franzén, B. 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.
8. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K., and Tyllia, M.M. 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440
Fax: +44 (0) 191 482 8442
Email: info@helena-biosciences.com
www.helena-biosciences.com

HL-2-1277P 2007/09 (5)